Aus der Medizinischen Universitätsklinik in Marburg
Direktor: Prof. Dr. G.-A. Martini

Untersuchung zur einfachen radioimmunologischen Testosteronbestimmung mit einer Kieselgelmikrosäule

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin des Fachbereiches Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von
Irene-Brigitte Jordan
aus Berlin

Marburg/Lahn 1977

1978

Fotodruck Symon und Wagner OHG · 3550 Marburg/Lahn · Biegenstr. 5

Aus der Medizinischen Universitätsklinik in Marburg
Direktor: Prof. Dr. G.-A. Martini

Untersuchung zur einfachen radioimmunologischen Testosteronbestimmung mit einer Kieselgelmikrosäule

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin des Fachbereiches Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von
Irene-Brigitte Jordan
aus Berlin

Marburg/Lahn 1977

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 31. März 1978
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Humanmedizin
Dekan: Prof. Dr. F. Neurath
Referent: Prof. Dr. H. Gerdes
Korreferent: Prof. Dr. H. G. Knauff

Meiner Beziehung gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546009_0080

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung 3

1. Übersicht über die radioimmunologische Steroidbestimmung 3
1.1. Geschichtliche Entwicklung 3
1.2. Grundsätzliche Hinweise zum Prinzip des Radioimmunoassays von Steroiden 5
1.2.1. Herstellung eines Antiserums 5
1.2.2. Radioaktive Steroide 7
1.2.3. Prozedur der Bestimmung 7
a) Proteinfällung
b) Abtrennung kreuzreagierender Steroide
c) Trennung von gebundenen und freien Steroiden

II. Experimentelle Untersuchungen 10

1. Ziel der Untersuchungen 10

2. Beschreibung der zu untersuchenden radioimmunologischen Plasmatestosteronbestimmungsmethode unter Verwendung einer Kieselgelmikrosäule 10
2.1. Extraktion und Chromatographie 10
2.2. Radioimmunologische Bestimmung 12
2.3. Herstellung der Kieselgelsäule 13
2.4. Herstellung der Charcoal-Dextran-Suspension 13

3. Herstellung und Charakterisierung des Testosteronantiserums 16
3.1. Durchführung der Immunisierung 16
3.2. Durchführung der Titerbestimmung 17
3.3. Durchführung der Kreuzreaktion 17
3.3.1. Ergebnis 18
3.3.2. Bewertung 19

4. Testosteronausbeute bei einmaliger Extraktion einer Serumprobe mit 25 ml Dichlormethan .. 19
4.1. Ziel des Versuches 21
4.2. Versuchsdurchführung 21
4.3. Ergebnis 21
4.4. Bewertung 21

5. Die chromatographische Reinigung von Testosteron auf der Kieselgelsäule 22
5.1. Ziel des Versuches 22
5.2. Versuchsdurchführung 23
5.3. Ergebnis 26

6. Überprüfung der Abtrennung von Cholesterin durch die Chromatographie mit der Kieselgelsäule 29
6.1. Ziel des Versuches 29
6.2. Versuchsdurchführung 29
6.3. Ergebnis 30
6.4. Bewertung 30

7. Testosteronausbeute nach Extraktion und chromatographischer Reinigung 30
7.1. Ziel des Versuches 30
7.2. Versuchsdurchführung 31
7.3. Ergebnis 31
7.4. Bewertung 31

8. Der Blankwert der Testosteronbestimmungsmethode 31
8.1. Gesamtmenge der als Blank wirkenden Substanzen bei der Testosteronbestimmungsmethode ... 32
8.1.1. Ziel des Versuches 32
8.1.2. Versuchsdurchführung 32
8.1.3. Ergebnis 33
8.1.4. Bewertung 33
8.2. Die Blankgröße bei Durchführung der vollstän-

digen Testosteronbestimmungsmethode 34
8.2.1. Ziel des Versuches 34
8.2.2. Versuchsdurchführung 34
8.2.3. Ergebnis 34
8.2.4. Bewertung 35

9. Vergleich der "Löslichkeit" von Kieselgel Bio-Rad in Benzol/Äthylacetat 85/15, Methanol und Äthanol 35
9.1. Ziel des Versuches 35
9.2. Versuchsdurchführung 35
9.3. Ergebnis 36
9.4. Bewertung 37

10. Die Empfindlichkeit der Testosteroneichkurve 37
10.1. Ziel des Versuches 37
10.2. Versuchsdurchführung 38
10.3. Ergebnis 38
10.4. Bewertung 38

11. Der Variationskoeffizient der Methode und der Einfluß verschiedener Darstellungen der Eichkurve auf diesen 39
11.1. Ziel des Versuches 39
11.2. Versuchsdurchführung 39
11.3. Ergebnis 39
11.4. Bewertung 49

12. Die Wiederfindung eingesetzter bekannter Testosteronmengen 50
12.1. Ziel des Versuches 50
12.2. Versuchsdurchführung 50
12.3. Ergebnis 50
12.4. Bewertung 51

13. Zur Durchführung der Versuche benutzte Hilfsmittel 52
13.1. Reagenzien 52
13.2. Glasgeräte 52

13.3. Apparative Ausrüstung 52
13.4. weitere Hilfsmittel 52

III. Zusammenfassung 53

IV. Literaturverzeichnis 56

I. EINLEITUNG

1. Übersicht über die radioimmunologische Steroidbestimmung

1.1. Geschichtliche Entwicklung

Der Ursprung des Radioimmunoassays geht auf das Jahr 1956 zurück, in dem Berson und Yalow mit J^{131} markiertem Insulin Versuche an Diabetikern durchführten (1). Sie stellten fest, daß das freie Insulin im Plasma durch Insulinantikörper, die sich als insulinbindende Gamma-Globuline erwiesen, gebunden wurde. Durch markiertes Insulin konnten die Autoren nachweisen, daß nach der erfolgten Bindung an den Antikörper ein Austausch von noch freiem Antigen gegen schon gebundenes Antigen möglich war. Damit war erwiesen, daß das Prinzip des kompetitiven Bindungsverhaltens, wie man es schon aus der Enzymkinetik kannte, auch im Bereich der Antigen-Antikörperwechselwirkung anwendbar ist.

Als steroidbindende Proteine können sowohl Plasmaproteine (6) (18) als auch Rezeptorproteine aus Steroiderfolgsorganen, als auch Antikörper gegen Steroide (3), die durch die Immunisierung von Tieren gewonnen wurden, verwendet werden.

Das Immunisieren von Tieren mit Substanzen von einem Molekulargewicht kleiner als 1000 ruft keine erkennbare Immunantwort hervor (4). Die kleinste Substanz, von der nachgewiesen wurde, daß sie immunogen wirkt, ist das Octapeptid Vasopressin mit einem Molekulargewicht von 1080 (9). Im allgemeinen werden daher Verbindungen mit einem Molekulargewicht kleiner 3000 als Hapten an ein Protein gekuppelt.

Bereits 1936 ist von Landsteiner versucht worden, Steroide an ein Carrierprotein zu kuppeln. Aber erst 1957 sind durch Erlanger und Liebermann (16) stabile Steroidproteinverbindungen hergestellt und Antikörper gegen Steroide erhalten worden. Es dauerte dann nochmals 10 Jahre, bis das

bei der radioimmunologischen Bestimmung von Peptidhormonen ausgearbeitete Prinzip 1969 für die Steroidbestimmung verwendet worden ist (3), da man vorher annahm, daß die steroidbindenden Antikörper eine relativ niedrige Affinität hätten, weswegen sie für die Messung von Hormonkonzentrationen in biologischen Flüssigkeiten nicht geeignet wären.

Seit 1969 von Abraham (3) der erste Radioimmunoassay für Plasmasteroide veröffentlicht wurde, hat die radioimmunologische Steroidbestimmung fast völlig das Feld der quantitativen Steroidanalyse erobert und alle anderen Techniken verdrängt. Als großer Vorteil der radioimmunologischen Steroidbestimmung ist die hohe Empfindlichkeit anzusehen. Wie die Abb. 1 zeigt, ist bei der Entwicklung der Methoden die Empfindlichkeit von 100 ng beim Bioassay über UV-Absorption, Fluoreszenzmethoden, Doppelisotopenverdünnung und Gaschromatographie bis zu wenigen pg bei den Proteinbindungsmethoden gesteigert worden. Die Verwendung von Rezeptoren aus Organen und von Antikörpern erbringt die höchste Empfindlichkeit.

Methode	Empfindlichkeit (ng)
Bioassay	100-10000
UV-Absorption und Spektrophotometrie	100- 2000
Fluoreszenzbestimmung	5- 50
Doppelisotopenverdünnung	0,5- 10
Gaschromatographie	
Flammenionisationsdetektor	5- 20
Elektroneneinfangdetektor	0,05- 1,0
Radioligandenbestimmung	
Plasmaproteine	1- 10
Rezeptorproteine	0,01- 0,1
Antiseren	0,005- 0,1

Abb. 1: Empfindlichkeit der Steroidbestimmungsmethoden

1.2. Grundsätzliche Hinweise zum Prinzip des Radioimmunoassays von Steroiden

1.2.1. Herstellung eines Antiserums

Um ein gebrauchsfähiges Antiserum zu erhalten, ist die Synthese von Steroidantigenen (Abb. 2), das Immunisieren von Tieren und das Charakterisieren der erhaltenen Antiseren durch Titer, Spezifität und Affinität erforderlich.

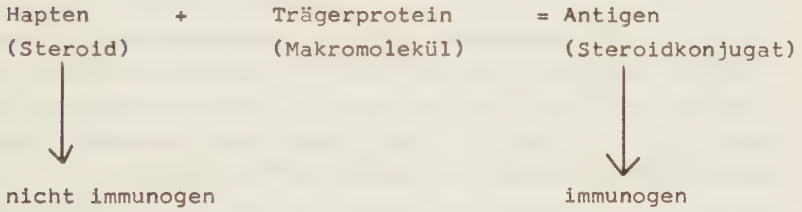


Abb. 2: Herstellung von immunogenen Steroidantigenen

Grundsätzlich erfolgt die Synthese von Steroidantigenen folgendermaßen (15):
Steroide enthalten mindestens eine Sauerstoffgruppe, entweder eine Ketogruppe oder eine Hydroxygruppe. Diese Gruppen können nicht erfolgreich zur Herstellung einer stabilen Bindung an ein Protein benutzt werden. Es muß unter Verwendung der Sauerstoffgruppe des Steroids ein Bindeglied zwischen Steroid und Protein eingefügt werden, welches reaktive Gruppen wie Carboxylgruppen, Aminogruppen oder andere funktionelle Gruppen enthält (16) (12). Zwischen diesen Gruppen und freien

Amino- oder Carboxylgruppen von Proteinen werden dann stabile Peptidbindungen gebildet. Die so erhaltenen Steroidantigene können zur Immunisierung benutzt werden.

Allgemein wird beim Immunisieren von Tieren Freundsches Adjuvans als emulgierendes Agens verwendet, in welchem das Immunogen den Tieren injiziert wird (5) (2). Die Art der Applikation ist unterschiedlich. Entweder mit oder ohne Boosterinjektion werden subcutane, intradermale, intramuskuläre und intraperitoneale Injektionen beschrieben. Auch Injektionen in Thymus, Lymphknoten oder Fußpfoten sind durchgeführt worden (7).

Die Charakterisierung der erhaltenen Antiseren hat zumindest durch Titerbestimmung und Spezifitätsbestimmung zu erfolgen. Der Titer ist definiert als die Antiserumverdünnung, bei der 50 % einer zugegebenen radioaktiven Steroidmenge gebunden sind (15). Dabei müssen die Bestimmungsbedingungen konstant gehalten werden, um die Titer verschiedener Antiseren miteinander vergleichen zu können. Da die Titergröße stark von den Versuchsbedingungen abhängt, sind die in der Literatur angegebenen Titergrößen in der Regel nicht miteinander vergleichbar.

Die Spezifität beruht auf dem Ausmaß der Kreuzreaktionen des Antiserums mit anderen Steroiden und ist die wichtigste Qualität des Antiserums. Die Spezifität eines Antiserums wird durch Verdrängungsstudien festgestellt. Die Kreuzreaktion wird berechnet aus dem Verhältnis der Masse des immunogenen Steroids (x), welche 50 % des radioaktiven immunogenen Steroids verdrängt,und der Masse des kreuzreagierenden Steroids (y), welche erforderlich ist, um die gleiche Menge des radioaktiven Steroids zu verdrängen:

$$\text{Kreuzreaktion} = \frac{x}{y} \times 100\ \%$$

Die Kreuzreaktion bestimmt die Gesamtspezifität des Radioimmunoassays und gibt an, wie weit die zu bestimmende Probe

vorgereinigt werden muß, um störende Substanzen zu entfernen. Da die chromatographische Reinigung eines Steroids der zeitaufwendigste Faktor eines Radioimmunoassays ist, wird von vielen Forschern versucht, die Spezifität des Antiserums zu steigern.

1.2.2. Radioaktive Steroide

Als radioaktive Steroide können entweder Beta- oder Gammastrahlen aussendende künstlich markierte Steroide verwendet werden. Für viele Steroide sind mit radioaktivem Wasserstoff markierte Verbindungen käuflich zu erhalten. Diese Steroide haben eine relativ hohe spezifische Aktivität, wobei der radioaktive Wasserstoff an einer, zwei oder vier verschiedenen Positionen in das Steroidmolekül eingefügt ist. Sie sind bei entsprechender Aufbewahrung über längere Zeit stabil, was aber in vierteljährlichen Abständen chromatographisch überprüft werden muß.
In geringem Ausmaß werden auch J^{125} markierte Steroide verwendet (10).

1.2.3. Prozedur der Bestimmung

a) Proteinfällung

Bei Verwendung von Serum müssen die steroidbindenden Proteine entfernt werden, da sie mit den Antikörpern um die freie Bindungsstelle konkurrieren.

In der Regel wird das durch Verwendung einer Lösungsmittelverteilung mit organischen Lösungsmitteln (8) erreicht. Die Wahl des Lösungsmittels richtet sich einmal nach der Reinheit des Lösungsmittels (Beitrag zum Blank), nach der Aggressivität des Lösungsmittels (Zersetzen von Steroiden) und nach dem Verteilungskoeffizienten.

b) Abtrennung kreuzreagierender Steroide

Die Spezifität des Antiserums ergibt eine strenge Indikation, ob eine chromatographische Vorreinigung erforderlich ist oder nicht.
In der Literatur werden dazu alle klassischen chromatographischen Trennverfahren beschrieben (Dünnschichtchromatographie mit Kieselgel und Aluminiumoxyd, Säulenchromatographie mit LH-20-Sephadex, Celite, Aluminiumoxyd, Papierchromatographie) (15) (8). Da die Praktikabilität durch Verwendung chromatographischer Verfahren sehr verschlechtert wird, versuchen viele Forscher, durch Steigerung der Spezifität von Antiseren Methoden ohne Chromatographie zu entwikkeln (14).

Da bisher diese Entwicklung noch nicht zu einem voll befriedigenden Ergebnis geführt hat, erweist es sich als notwendig, auch die chromatographischen Verfahren weiter zu vereinfachen, um die Praktikabilität zu erhöhen.

c) Trennung von gebundenen und freien Steroiden

Ein anderer, die Zahl der Bestimmungen, die nebeneinander durchgeführt werden können und die Streuung der Methode stark beeinflussender Faktor ist die Trennung von antiköpergebundenen und freien Steroiden (8). Wie die Abb. 3 zeigt, sind eine Reihe von methodischen Versuchen zur Lösung dieses Problems durchgeführt worden. Die Verwendung von mit Dextran beschichteter Holzkohle hat die weiteste Verbreitung gefunden. Auch die Fällung der gebundenen Fraktion mit Ammoniumsulfat wird häufig durchgeführt. Die einfachste und schnellste Trennungstechnik scheint die Verwendung von Solide-Phase-Systemen zu sein, wobei Antikörper fest an eine nicht lösliche Matrix gebunden sind (3). Da die bisher veröffentlichten Erfahrungen gezeigt haben, daß die Bindung der Antikörper an nicht lösliche Substanzen mit einer Einbuße an Empfindlichkeit verbunden ist, haben sich diese Methoden noch nicht stärker durchgesetzt.

1. Adsorption der freien Fraktion mit
   a. Dextranbeschichteter Kohle
   b. Hämoglobinbeschichteter Kohle
   c. Florisil

2. Präzipitation der gebundenen Fraktion mit
   a. Ammoniumsulfat
   b. Polyäthylenglycol

3. Immunologische Präzipitation der gebundenen Fraktion mit
   a. Doppelantikörpern

4. Solidphase-Technik

5. Toluolextraktion der freien Fraktion

Abb. 3: Methoden zur Trennung von gebundenen und freien Steroiden (8)

II. Experimentelle Untersuchungen

1. Ziel der Untersuchungen

Vorausgehende Untersuchungen hatten das Ziel, Antikörper gegen Testosteron von so hoher Spezifität zu erhalten, daß eine chromatographische Vorreinigung nicht erforderlich ist. Wir haben dabei untersucht, ob eine Kopplung von Testosteron an verschiedenen Positionen des Moleküls an Albumin entsprechende Verbesserungen der Spezifität erbringt. Leider konnten wir mit keinem der Verfahren eine so hohe Spezifität erzielen, daß sich eine chromatographische Vorreinigung erübrigt (12).

Wir haben uns deswegen entschlossen, die Praktikabilität des chromatographischen Verfahrens so weit zu steigern, daß eine größere Anzahl von Proben gleichzeitig bestimmt werden kann, und die methodische Übereinstimmung bei der Bestimmung verschiedener Steroide so groß ist, daß diese gut nebeneinander bearbeitet werden können.

Dazu entwickelten wir eine Kieselgelsäule, von Goldzieher zum Entfetten beschrieben weiter, so daß sie als Mikrosäule auch zur chromatographischen Trennung brauchbar ist. Umfangreiche Voruntersuchungen haben gezeigt, daß beim Vergleich verschiedenster Kieselgelarten nur das mit Säure und organischem Lösungsmittel vorgereinigte Kieselgel der Firma Bio-Rad Laboratories bei niedrigem Blank eine so gute Trenneigenschaft hat, daß es zum Einsatz im Radioimmunoassay verwendet werden kann.

2. Beschreibung der zu untersuchenden radioimmunologischen Plasmatestosteronbestimmungsmethode unter Verwendung einer Kieselgelmikrosäule

2.1. Extraktion und Chromatographie

a) In 30 ml Spitzkolben, die in die Einsätze einer normalen

Laborzentrifuge passen, werden nach den zu erwartenden Testosteronkonzentrationen entsprechende Mengen Serum pipettiert. Bei normalem Männerserum werden 0,5 ml Serum mit 1,5 ml aqua dest. auf 2 ml aufgefüllt. Bei normalem Frauenserum werden 2 ml Serum verwendet. Sind sehr niedrige Testosteronwerte zu erwarten, müssen die Serummengen erhöht werden.
Zu dem in die Spitzkolben pipettierten Serum werden 2000 cpm [$1,2^3$-H] Testosteron als interner Standard gegeben. Das radioaktive Testosteron ist so in Benzol gelöst, daß 10 µl 2000 cpm entsprechen. Nach Zugabe des internen radioaktiven Standards wird das Serum eine halbe Stunde lang bei Raumtemperatur stehen gelassen, um eine möglichst gleiche Bindung von endogenem und zugesetztem radioaktiven Standard zu erreichen, da unterschiedliche Bindungsverhältnisse zu einer unterschiedlichen Menge extrahierten Steroids führen sollen. Es wäre dann eine Steroidkonzentration zu erwarten, die gegenüber der vorhandenen zu niedrig ist.

b) Nach Zugabe von 25 ml Dichlormethan wird das Serum durch 15-minütiges Schütteln extrahiert. Es empfiehlt sich, die Schüttelgeschwingikeit nicht all zu hoch zu wählen, da es dann öfters zu Emulsionsbildung kommt.

c) Durch kurzzeitiges Zentrifugieren der Spitzkolben in einer Laborzentrifuge (5 min. bei 3000 Umdrehungen/min.) kommt es zu einer guten Trennung der organischen und wässrigen Phase.

d) Nach dem Abzentrifugieren wird die Dichlormethanphase direkt, ohne einzudampfen, mit einer Pipette (20 ml) über einen Phasentrennfilter auf die Kieselgelsäule pipettiert. Durch den Phasentrennfilter wird Wasser im Filter zurückgehalten, während der organische Extrakt ungehindert durchläuft. Zusätzlich werden noch Serumbestandteile abgefiltert. Ein Waschen und Trocknen des Extraktes ist deshalb nicht nötig.

Beim Durchlaufen des Extraktionsmittels werden die Steroide in der obersten Schicht der Säule adsorbiert (Start).

e) Nach dem Durchlaufen des Extraktionsmittels wird durch Zugabe von 30 ml Benzol/Äthylacetat 85/15 (Vol/Vol) eluiert. Dabei wandern entsprechend ihrem Adsorptions- und Lösungsverhalten die Steroide unterschiedlich schnell durch die Säule.

f) Testosteron wird in der Fraktion vom 12. bis zum 22. ml eluiert. Diese Fraktion wird aufgefangen, während das vorausgehende Dichlormethaneluat und die ersten 11 ml des Benzol/Äthylacetateluats weggeschüttet werden.
Die Testosteronfraktion wird unter Stickstoff in einem Wasserbad bei 45°C eingedampft.

g) Der Rückstand wird in 1 ml Äthanol gelöst. 2 Aliquote werden in Szintillationsgefäße zur Messung der Wiederfindung pipettiert. 2 Aliquote werden in 12 ml-Glasröhrchen zur radioimmunologischen Konzentrationsbestimmung pipettiert.

2.2. Radioimmunologische Bestimmung

Zur Herstellung der Eichkurve wird eine eingewogene inaktive Testosteronmenge in Äthanol gelöst und so verdünnt, daß die erforderlichen Testosteronmengen für die Eichkurve in 0,1 ml Äthanol vorliegen (500 pg, 250 pg, 125 pg, 100 pg, 50 pg, 25 pg, 12,5 pg, 6,25 pg, 0 pg/0,1 ml Äthanol).
Zusammen mit den äthanolischen zu bestimmenden Proben werden 0,1 ml des Eichkurvenstandards in Glasröhrchen pipettiert und im Exsiccator unter Vacuum bei Anschluß an die Wasserstrahlpumpe verdampft. Zu den eingedampften Rückständen werden 0,5 ml Antikörperlösung gegeben und gut vermischt.
In Anlehnung an den Titer ist das Antiserum mit einer Phosphatpufferlösung (0,1 m Phosphatpuffer pH 7,4, 0,9 % NaCl, 0,1 % Natriumazid, 0,2 % Gamma-Globulin) so verdünnt worden, daß die Eichkurve in dem für die Bestimmung optimalen Empfind-

lichkeitsbereich liegt.

Die Proben werden 18 bis 24 Stunden lang im Eisschrank bei etwa 4°C inkubiert. Die Trennung der freien und gebundenen Fraktion erfolgt mit 0,5 ml eines Charcoal-Dextran-Gemisches. Nach Zugabe des Charcoal-Dextran-Gemisches werden die durch ein Eisbad gekühlten Proben mit einem Mixer gut durchmischt. Nach genau 10 min. werden die Proben in einer Kühlzentrifuge bei 2500 U/min. 15 min. lang abzentrifugiert und mit einer Eppendorfpipette 0,5 ml des Überstandes in ein Szintillationsgefäß pipettiert, wobei darauf zu achten ist, daß keine Kohlepartikel mit überführt werden.

2.3. Herstellung der Kieselgelsäule

Zur Säulenchromatographie wird die in Abb. 4 dargestellte Säule verwendet.

Der Säulenabschluß besteht aus 5 mm fest gepresster, vorher mit aqua bidest und Methanol gereinigter Glaswolle. Darüber sind 2 passend ausgestanzte Glasfaserfilter GF/D und 1 Glasfaserfilter GF/F geschichtet. Dieser Säulenabschluß hat sich in vielen Vorversuchen als der erwiesen, der bei ausreichender Laufgeschwindigkeit einen annehmbaren Blank zuläßt.

Vor dem Einfüllen in die Säule wird das Kieselgel ohne weitere Vorbehandlung oder Aktivierung mit Benzol/Äthylacetat 98/2 (Vol/Vol) gut vermischt. Mit einer Pipette wird diese Suspension in die Säule gefüllt, so daß eine 7 cm hohe Kieselgelsäule entsteht. Ohne weiteres Voreluieren ist diese Säule sofort benutzbar. Die Herstellungsdauer der Säule beträgt etwa 3 Minuten.

2.4. Herstellung der Charcoal-Dextran-Suspension

250 mg Norit A und 25 mg Dextran werden in 100 ml Phosphatpuffer (0,1 m Phosphatpuffer pH 7,4, 0,1 % Natriumazid,

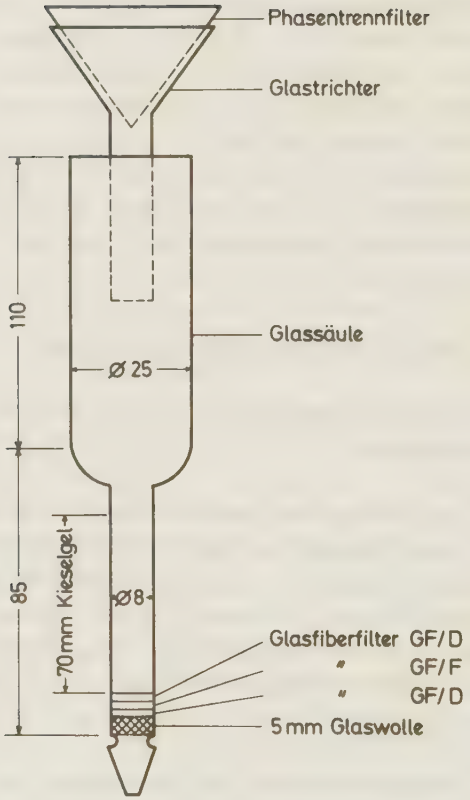


Abb. 4: Kieselgelsäule zur Steroidisolierung

0,9 % NaCl, 2 mg/ml Gamma-Globulin) überführt und mindestens eine Stunde auf einem Magnetrührer gerührt. Vor der Zugabe zur Antikörperlösung muß die Charcoal-Dextran-Suspension mindestens 15 min. auf einem Magnetrührer gerührt werden. Während des Abpipettierens muß die Charcoal-Dextran-Suspension ebenfalls auf dem Magnetrührer in gleichmäßiger Suspension gehalten werden.

Abzentrifugieren der Charcoal-Dextran-Suspension, Wegschütten des Überstandes und erneutes Suspendieren in Puffer, wie es von einigen Autoren durchgeführt wird, um feinste Kohlepartikel, die nicht abzentrifugiert werden, mit dem Überstand wegzuschütten, wurde in Vorversuchen untersucht. Es konnte durch dieses Verfahren keine Verbesserung der Streuung erreicht werden.

3. Herstellung und Charakterisierung des Testosteron-antiserums

Um für radioimmunologische Steroidbestimmungen ein möglichst spezifisches Antiserum mit hoher Affinitätskonstante zu erhalten, ist es erforderlich, das Steroidmolekül an ein Eiweiß zu koppeln, Tiere damit zu immunisieren und zur Antikörperbildung anzuregen. Dabei werden verschiedene Kopplungsarten benutzt. Um die Spezifität von Antiseren zu erhöhen, sind verschiedene C-Atome des Testosterons zum Koppeln benutzt worden in der Vorstellung, daß die antigene Information des Teils des Testosteronmoleküls, das nicht an der Kopplung beteiligt ist, möglichst groß ist. So sind die C-Atome C_3, C_7 (17), C_{17}, C_{11} (11) als Kopplungsort benutzt worden.

In vorliegender Untersuchung wurde ein Antigen mit einer Kopplung an C_7 über einen Thioäther an BSA nach Lindner (17) verwandt. Die Antigensynthese wurde von R. Müller, Physiologisch-Chemisches Institut Bonn durchgeführt.

3.1. Durchführung der Immunisierung

3 mg Antigen bei der ersten Immunisierung, 1 mg Antigen bei den Boosterinjektionen wurden in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Diese Lösung wurde mit 1 ml komplettem Freundschem Adjuvans gut vermischt und einem weißen Neuseelandkanninchen an mehreren Stellen subcutan injiziert. Die Injektionen wurden im ersten Monat wöchentlich einmal durchgeführt, in der nächsten Zeit etwa alle 3 bis 4 Wochen. Nach etwa einem Viertel Jahr wurde aus den Ohrvenen der Tiere zum ersten mal Blut in einer heparinisierten Spritze entnommen. Nach Abzentrifugieren wurde das Serum in 1 ml-Proportionen in Eppendorfgefäße pipettiert und bei $-20^{\circ}C$ eingefroren. Nach einem Viertel Jahr entwickelten die Kanninchen häufig einen Titeranstieg als Hinweis auf Antikörper, die für die radioimmunologische Bestimmung brauchbar waren.

3.2. Durchführung der Titerbestimmung

Zur Durchführung der Titerbestimmung (15) wurde ein antikörperhaltiges Serum so verdünnt, daß je nach dem zu erwartenden Titer Verdünnungsreihen bis 1:5000 bzw. 1:100 000 entstanden. Die Verdünnung stellten wir mit einer Phosphatpufferlösung (0,1 m Phosphatpuffer pH 7,4, 0,9 % NaCl, 0,1 % Natriumazid, 2 mg/ml Gamma-Globulin vom Rind) her.

Unter dem Titer verstehen wir die Verdünnung, bei der nach Inkubation mit etwa 10 000 cpm [1,2-^{3}H] Testosteron 18 Stunden lang bei etwa 4°C und Trennung der freien und gebundenen Steroide mit der beschriebenen Charcoal-Dextran-Suspension 50 % der eingesetzten Testosteronmenge an das Serum gebunden werden.

3.3. Durchführung der Kreuzreaktion

Bevor ein Antiserum zu einer radioimmunologischen Bestimmung verwendet werden kann, muß die Größe der Kreuzreaktion mit allen Steroiden bestimmt werden, von denen zu erwarten ist, daß sie die Bestimmung auf Grund ihrer Affinität zum Antiserum stören (3). Die Spezifität des Antiserums wird dadurch ermittelt, daß man das Antiserum mit dem radioaktiven Steroid, gegen das es entwickelt wurde nach der üblichen Weise inkubiert, wobei eine Eichkurve mit dem Hauptsteroid und eine Eichkurve mit dem auf seine Kreuzreaktion hin zu untersuchenden störenden Steroid hergestellt wird. Die Kreuzreaktion berechnet man entsprechend der Formel von Abraham (3):

$$\text{Prozentuale Kreuzreaktion} = \frac{\text{Menge des inaktiven Hauptsteroids, welches 50 \% des am Nullwert gebundenen radioaktiven Steroids verdrängt} \times 100}{\text{Menge des kompetitiv hemmenden Steroids, welches 50 \% des beim Nullwert gebundenen radioaktiven Hauptsteroids verdrängt}}$$

Nach dieser Vorschrift wurden die prozentualen Kreuzreaktionen für 15 Steroide bestimmt.

3.3.1. Ergebnis

Die Tab. 1 zeigt die Kreuzreaktionen des verwendeten Antiserums gegen Testosteron-7-Thioäther-BSA.

Steroid	% Kreuzreaktion
Testosteron	100 %
5α-Dihydrotestosteron	65 %
Dehydroepiandrosteron	< 0,2 %
Epitestosteron	< 0,2 %
5α-Androstan-3α, 17β diol	2,1 %
△4-Androstandion	< 0,2 %
5α-Androstandion	< 0,2 %
Androsteron	< 0,2 %
5β-Dihydrotestosteron	1,5 %
Aetiocholanolon	< 0,2 %
Epiandrosteron	< 0,2 %
△5-Androstendiol	1,5 %
Corticosteron	< 0,02 %
Cortisol	< 0,02 %
Oestradiol	< 0,02 %
Progesteron	< 0,02 %

Tab. 1: Kreuzreaktionen des verwendeten Antiserums gegen Testosteron-7-Thioaether-BSA (Synthese R. Müller, Bonn)

3.3.2. Bewertung

Die Tab. 1 zeigt, daß von allen 15 Steroiden nur für 5α-Dihydrotestosteron mit 65 % eine höhere Kreuzreaktion vorliegt. Da im Normalserum die Konzentration von 5α-Dihydrotestosteron nur etwa ein Zehntel der des Testosterons beträgt und keine pathologischen Zustände mit isolierter Erhöhung von 5α-Dihydrotestosteron bekannt sind, dürfte die Störung durch 5α-Dihydrotestosteron, wenn keine Chromatographie durchgeführt wird, nicht über 10 % liegen.

Bei den anderen Steroiden ist die Kreuzreaktion so gering, daß sie auch bei Vorliegen höherer Konzentrationen im Serum in der Regel keine ins Gewicht fallende Störmöglichkeit darstellen.

Es muß bei radioimmunologischer Testosteronbestimmung deshalb von der Fragestellung ausgehend überprüft werden, ob und wie intensiv eine chromatographische Reinigung erforderlich ist.

4. Testosteronausbeute bei einmaliger Extraktion einer Serumprobe mit 25 ml Dichlormethan

Bei der Extraktion von Testosteron aus dem Serum sollten drei Ziele angestrebt werden:

a) Extraktion von Testosteron in hoher Ausbeute bei niedriger Ausbeute störender Steroide
b) Hohe Extraktionsausbeute von Testosteron mit einmaliger Extraktion und geringen Mengen von Extraktionsmittel
c) Einfache Handhabung des Extraktionsmittels (Giftigkeit, Emulsionsbildung, Verdampfungstemperatur).

Bei der Wahl des Extraktionsmittels erleichtern Tabellen mit Verteilungskoeffizienten von Testosteron und organischen Lösungsmitteln die Auswahl. Tab. 2 (Die Tabelle wurde uns von der Firma Isotopendienst West zur Verfügung gestellt.)

Steroide	Hexan ε=1.9 d=0.66 p.e.=68°	Tetrachlorkohlenstoff ε=2.2 d=1.6 p.e.=77°	Benzol ε=2.3 d=0.79 p.e.=80°	Äther ε=4.4 d=0.71 p.e.=35°	Äthylacetat ε=6.4 d=0.90 p.e.= 76°	Dichlormethan ε=9.1 d=1.3 p.e.=40°
Progesteron	60.1 ± 1.3	62.3 ± 1.2	79.8 ± 2.6	70.4 ± 2.6	76.5 ± 5.1	25.1 ± 0.9
17- Hydroxy-progesteron	6.6 ± 0.6	59.0 ± 3.5	82.5 ± 2.2	70.9 ± 0.9	87.6 ± 4.0	61.2 ± 2.0
Pregnenolon	61.9 ± 1.0	66.3 ± 1.5	80.6 ± 8.6	72.3 ± 2.4	73.0 ± 3.6	50.2 ± 1.5
Testosteron	27.8 ± 2.4	66.1 ± 1.0	89.7 ± 1.0	80.0 ± 8.5	88.6 ± 4.0	72.2 ± 1.0
Dihydro-testosteron	44.2 ± 1.0	53.0 ± 1.0	67.6 ± 6.7	61.1 ± 3.5	71.4 ± 2.7	54.2 ± 1.7
Androstendion	69.3 ± 3.1	79.3 ± 3.2	94.3 ± 1.0	89.5 ± 4.5	92.0 ± 3.8	48.0 ± 1.0
Aldosteron	0.3 ± 0.1	8.0 ± 0.8	52.1 ± 1.0	63.6 ± 3.3	92.8 ± 1.6	93.6 ± 3.7
Cortisol	1.0 ± 0.1	5.1 ± 0.5	18.4 ± 0.7	68.9 ± 4.4	74.6 ± 1.0	73.8 ± 6.0
Corticosteron	7.0 ± 0.9	48.2 ± 2.1	73.3 ± 0.8	85.8 ± 3.6	85.9 ± 2.5	83.2 ± 2.2
Oestradiol	6.4 ± 0.7	48.9 ± 2.9	79.1 ± 0.6	83.5 ± 2.0	81.1 ± 1.1	81.7 ± 1.4
Oestron	18.5 ± 2.0	62.6 ± 3.5	86.4 ± 1.2	58.1 ± 0.7	75.4 ± 2.6	64.0 ± 1.0
Oestriol	0.2 ± 0.2	1.2 ± 0.8	9.0 ± 0.2	100 ± 4.6	95.5 ± 2.9	59.0 ± 4.5

Tab. 2: Extraktionsausbeute von Steroiden in verschiedenen Lösungsmitteln

Um bei der Bestimmung verschiedener Steroide eine möglichst große Übereinstimmung der Methode zu erzielen, haben wir mit Dichlormethan ein Extraktionsmittel gewählt, das alle uns interessierenden Steroide in guter Ausbeute extrahiert. Aus diesem Grund haben wir darauf verzichtet, die Spezifität der Methode durch die Wahl eines "spezifischen" Extraktionsmittels für Testosteron zu erhöhen.

4.1. Ziel des Versuches

Bestimmung der Ausbeute an radioaktivem Testosteron bei einmaliger Extraktion mit Dichlormethan.

4.2. Versuchsdurchführung

In 30 ml Spitzkolben wurde ein Aliquot von radioaktivem Testosteron (in Benzol gelöst) eingedampft. Dazu wurden 0,5 ml Plasma eines Plasmapools und 1,5 ml aqua dest. gegeben. Nach Zupipettieren von 25 ml Dichlormethan wurde 15 min. auf einem Schüttler geschüttelt und anschließend nach kurzem Abzentrifugieren die Dichlormethanphase in große Zentrifugengläser überführt und eingedampft. Der Rückstand wurde in 1 ml Methanol gelöst. 0,5 ml wurden in ein Szintillationsgefäß überführt, nach Zugabe von 7 ml Szintillationsflüssigkeit Szinti-Gel im Beta-Zähler gemessen und mit der eingesetzten Menge radioaktiven Testosterons verglichen.

4.3. Ergebnis

Bei 8 Proben wurden 93,2 $\pm$ 6,2 % der eingesetzten radioaktiven Testosteronmengen wiedergefunden.

4.4. Bewertung

Die Ausbeutungsrate ist so groß, daß eine einmalige Extraktion ausreicht. Schwierigkeiten durch Emulsionsbildung traten nicht auf.

5. Die chromatographische Reinigung von Testosteron auf der Kieselgelsäule

Um eine korrekte Bestimmung von Steroidwerten in biologischem Material zu erreichen, müssen vorher alle Substanzen, die die radioimmunologische Bestimmung stören, entfernt werden.

Dabei kann es sich um Substanzen handeln, die kompetitiv mit dem zu bestimmenden Steroid um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren, sei es, daß sie eine hohe Kreuzreaktion mit dem zu bestimmenden Steroid zeigen, was einer hohen Affinitätskonstant entspricht, sei es, daß sie bei niedriger Kreuzreaktion in hoher Konzentration im biologischen Material vorliegen. Entfernt werden müssen auch Stoffe, die ohne eine Kreuzreaktion zu zeigen, die Bindungsfähigkeit stören.

5.1. Ziel des Versuches

Neben den in hoher Konzentration im Serum vorliegenden Lipiden muß bei menschlichem Serum meistens nur das stark kreuzreagierende 5α-Dihydrotestosteron aus der zu bestimmenden Probe entfernt werden.
Wie wir in Vorversuchen gesehen haben, ist das Trennverhalten der Steroide auf der Kieselgelsäule in etwa gleich dem Verhalten der Steroide bei der Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten mit dem gleichen Lösungsmittel. Durch 2 Lösungsmittelsysteme, Benzol/Äthylacetat und Dichlormethan/Äther, wird auf der Kieselgelplatte eine besonders gute Trennung von 5α-Dihydrotestosteron und Testosteron erreicht. Diese Systeme wurden deshalb in verschiedenen Mischungsverhältnissen bei der Elution von Testosteron und 5α-Dihydrotestosteron auf der Kieselgelsäule untersucht, um das System mit der besten Trennfähigkeit herauszufinden.

5.2. Versuchsdurchführung

3 Kieselgelsäulen wurden wie auf Seite 14 beschrieben hergestellt. Um den wahren Verhältnissen entsprechende Versuchsbedingungen zu erhalten, wurden nach Zugabe je eines radioaktiven Aliquots 2 ml Serum mit 25 ml Dichlormethan extrahiert. Der Extrakt wurde über einen Phasentrennfilter auf die Säule gegeben. Die anschließende Elution je einer Säule erfolgte mit 25 ml Benzol/Äthylacetat 70/30, 80/20 oder 85/15.
Das Eluat wurde in 2 ml - Fraktionen aufgefangen. 0,5 ml wurden in ein Szintillationsgefäß gegeben und nach Zugabe von Szintillationsflüssigkeit im Beta-Zähler gemessen.

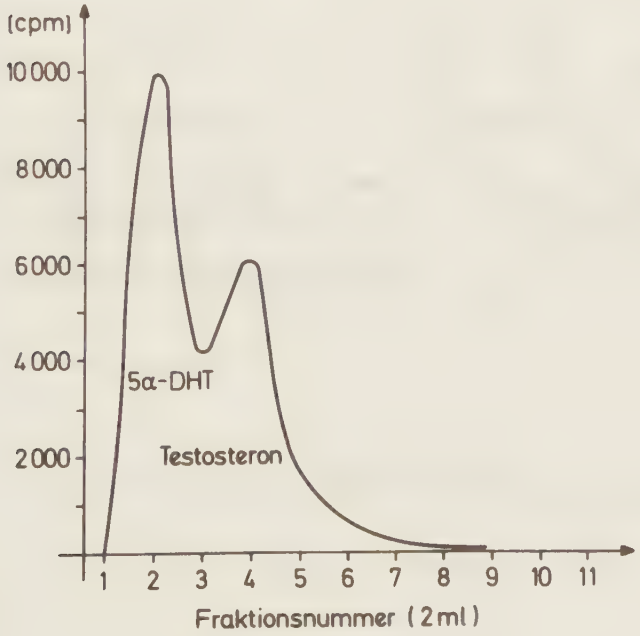


Abb. 5: Elutionsmittel Benzol/Äthylacetat 70/30

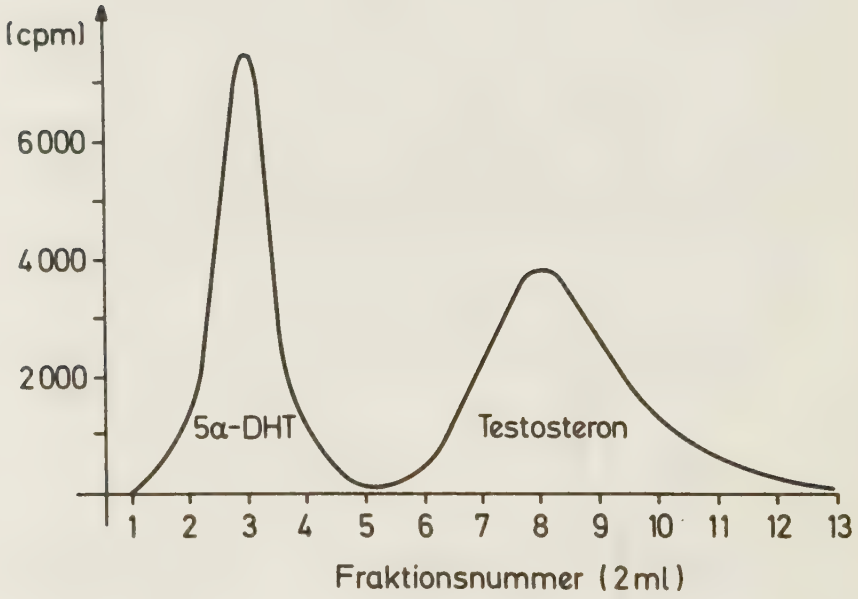


Abb. 6: Elutionsmittel Benzol/Äthylacetat 80/20

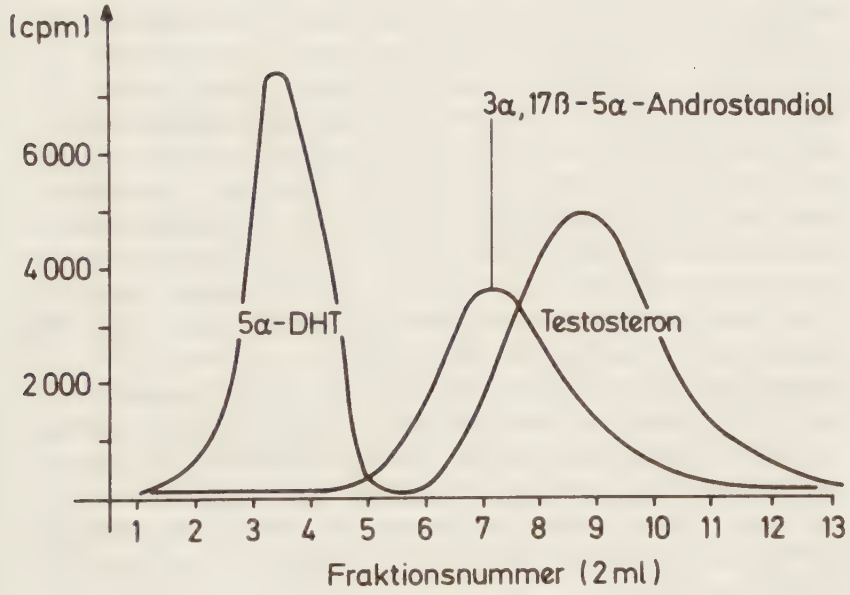


Abb. 7: Elutionsmittel Benzol/Äthylacetat 85/15

5.3. Ergebnis

Wie die Abbildungen 5, 6 und 7 zeigen, werden bei dem polareren Mischungsverhältnis Benzol/Äthylacetat 70/30 Testosteron und 5α-Dihydrotestosteron in einer relativ frühen Fraktion eluiert und kaum getrennt. Durch Verwendung von Gemischen, die weniger polar sind, erfolgt eine eindeutige Trennung von Testosteron und 5α-Dihydrotestosteron. Mit dem Elutionsmittel Benzol/Äthylacetat 85/15 werden Testosteron und 5α-Dihydrotestosteron sehr gut getrennt. In weiteren Versuchen konnten wir feststellen, daß bei konstanter Einhaltung der Versuchsbedingungen die Peaklage sehr gut reproduzierbar ist, was es ermöglicht, ohne vorheriges Austesten der Säule durch Auffangen der Elutionsfraktion vom 12. bis 22. ml, den Testosteronpeak ohne Überlappung mit dem 5α-Dihydrotestosteronpeak zu isolieren. Wie die Abb. 7 zeigt, gelingt es beim Elutionssystem Benzol/Äthylacetat 85/15 nicht, das bei manchen Antikörpern durch hohe Kreuzreaktion störende 3α, 17β-5α Androstandiol abzutrennen. Da dieses Steroid jedoch mit unserem Antikörper eine niedrige Kreuzreaktion hat, im Serum in geringer Menge vorkommt und keine isolierten pathologischen Erhöhungen beschrieben sind, erübrigt sich in der Regel eine Abtrennung.

Wie wir bereits früher gesagt haben, entspricht das Trennverhalten der Steroide auf der Kieselgelsäule dem auf der Dünnschichtplatte. Wir haben deshalb 30 verschiedene Steroide auf einer nicht aktivierten Dünnschichtplatte Polygram Sil G/UV 254 in dem Laufmittel Benzol/Äthylacetat 85/15 3 mal laufen gelassen. Die Tabelle 3 zeigt, welche Steroide ein ähnliches Laufverhalten wie Testosteron haben und bei der Trennung auf der Kieselgelsäule in der Elutionsfraktion des Testosterons zu erwarten sind. Von einem Teil dieser Steroide wissen wir aus unseren Untersuchungen, daß sie eine zu vernachlässigende Kreuzreaktion mit Testosteron bei Verwendung unserer Antikörper zeigen. Von einem anderen Teil ist auf Grund des

Steroid	Abstand Start-Steroid = $\bar{x}$
Cholesterin	9,5
Progesteron	7,9
5α-Androstandion	9,6
Androstendion	5,9
Androsteron	4,8
5α-Dihydrotestosteron	5,7
Dehydroepiandrosteron	5,7
17α-Hydroxyprogesteron	3,0
Aetiocholanolon	3,0
Testosteron	2,7
Epiandrosteron	4.8
Epitestosteron	2,3
5β-Androstandion	9,0
5β-Dihydroxytestosteron	4,1
Δ4-Androsten-3, 17, 11-trion	2,9
5β-Androstan-3β ol-17on	6,8
Δ5-Androsten-3β, 17β diol	3.8
5α-Androstan-3α, 17β diol	3,2
5β-Androstan-3α, 17β diol	1,4
5α-Androstan-3β, 17β diol	3,6
5β-Androstan-3β, 17β diol	4,3
11-Desoxycorticosteron	2,8
11-Desoxycortisol	0,84
Corticosteron	0,39
Cortisol	0,175
Cortison	0,39
Aldosteron	0,13
Oestron	13,8
Oestradiol	7,86
Oestriol	0,35

Tab. 3: Laufverhalten verschiedener Steroide auf der Dünnschichtplatte Polygram Sil G/UV 254, nicht aktiviert bei Verwendung des Laufmittels Benzol/Äthylacetat 85/15 und dreimaligem Laufen

Steroidmoleküls bei Vergleich mit Testosteron nicht zu erwarten, daß eine stärkere Kreuzreaktion eintritt. Ein dritter Teil kommt in sehr geringen Mengen im Serum vor.

Ein weiteres Laufmittel, das auf der Dünnschichtplatte eine gute Trennung von 5α-Dihydrotestosteron und Testosteron ergibt, ist Dichlormethan/Äther 80/20. Nach Vorversuchen haben wir bei identischen Versuchsbedingungen erreicht, daß mit dem Elutionsmittel Dichlormethan/Äther 90/10 Testosteron nach einwandfreier Abtrennung von 5α-Dihydrotestosteron in der Fraktion vom 12. bis 22. ml eluiert wird.

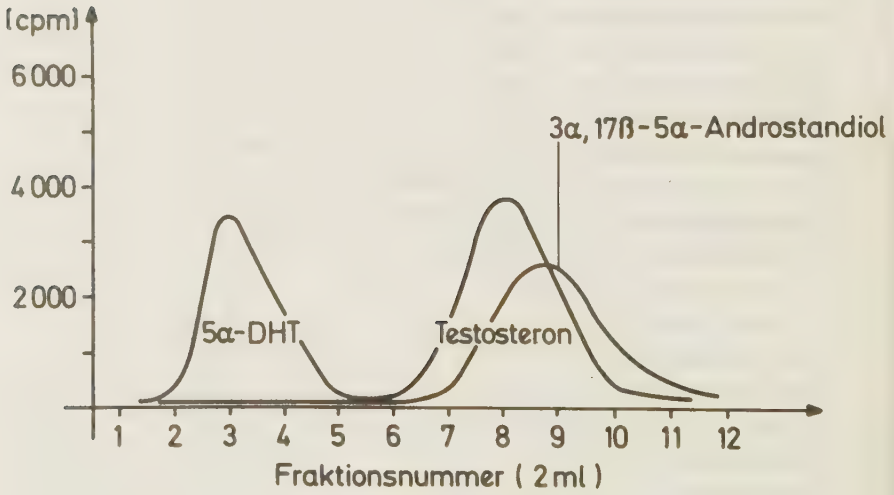


Abb. 8: Elutionsmittel Dichlormethan/Äther 90/10

Wie die Abb. 8 zeigt, wird auch bei diesem Elutionsmittel keine Trennung von Testosteron und 3α, 17β-5α-Androstandiol erreicht.

Die bisherigen Erfahrungen haben gezeigt, daß sowohl Benzol/Äthylacetat 85/15 als auch Dichlormethan/Äther 9o/10 gut als Elutionssysteme verwendet werden können. Versuche, durch Veränderung der Säulendimension die Abtrennung von 3α, 17β-5α-Androstandiol zu erreichen, wurden nicht durchgeführt.

6. Überprüfung der Abtrennung von Cholesterin durch die Chromatographie mit der Kieselgelsäule

6.1. Ziel des Versuches

Obwohl Cholesterin bei der Chromatographie mit der Kieselgelsäule als sehr unpolares Lipid lange vor Testosteron eluiert wird, haben wir die Verunreinigung der Testosteronfraktion mit Cholesterin überprüft, da die Cholesterinkonzentration im Serum millionenfach höher ist als die des Testosterons und deshalb eine Überladung der kleinen Kieselgelsäule mit Cholesterin denkbar wäre.

6.2. Versuchsdurchführung

Zu 4 Serumproben von 2 ml wurden 10 µl einer Lösung radioaktiven Cholesterins in Benzol pipettiert. Gleiche Aliquote von radioaktivem Cholesterin wurden im Beta-Zähler gemessen.

Die Serumproben wurden nach halbstündigem Stehenlassen bei Raumtemperatur mit 25 ml Dichlormethan extrahiert. Der Extrakt wurde über einen Phasentrennfilter auf die in beschriebener Weise hergestellte Kieselgelsäule gebracht. Nach Durchlaufen des Dichlormethanextraktes, den wir in Spitzröhrchen sammelten, wurden 35 ml Benzol/Äthylacetat 85/15 auf die Säule gegeben. Die ersten beiden Fraktionen von je 12 ml wurden aufgefangen und ebenso wie das Dichlor-

methaneluat unter Stickstoff eingedampft. Der Rückstand wurde in 1 ml Methanol gelöst und 0,5 ml davon im Beta-Zähler gemessen.

6.3. Ergebnis

Von der dem Serum zugesetzten radioaktiven Cholesterinmenge wurden 21,5 $\pm$ 12,3 % durch die einmalige Extraktion mit Dichlormethan extrahiert. 71,5 % des extrahierten Cholesterins werden nach der Chromatographie in der Dichlormethanfraktion, 22,7 $\pm$ 3.5 % in den ersten 12 ml der Benzol/Äthylacetatfraktion und 4,6 $\pm$ 2,0 % in den zweiten 12 ml der Benzol/Äthylacetatfraktion (Testosteronfraktion) wiedergefunden.
Die wiedergefundene Cholesterinmenge in der Testosteronfraktion beträgt 0,83 $\pm$ 0,4 % der eingesetzten radioaktiven Cholesterinmenge.

6.4. Bewertung

Von dem den Serumproben zugesetzten radioaktiven Cholesterin wird nur etwa ein Viertel durch einmaliges Ausschütteln mit Dichlormethan extrahiert. Davon finden sich etwa Dreiviertel in der Dichlormethanfraktion wieder. Nur etwa 4 % des extrahierten Cholesterins werden in der Testosteronfraktion nachgewiesen. Da Cholesterin eine zu vernachlässigende Kreuzreaktion mit den Testosteronantiseren zeigt, dürfte die in der Testosteronfraktion gefundene Cholesterinmenge keinen Einfluß auf die Testosteronbestimmung haben.

7. Testosteronausbeute nach Extraktion und chromatographischer Reinigung

7.1. Ziel des Versuches

a) Bestimmung des Gesamtverlustes an Testosteron nach Extraktion aus dem Serum und chromatographischer Reinigung
b) Reproduzierbarkeit der Ausbeute von Testosteron nach der Säulenchromatographie ohne vorherige Überprüfung der

Testosteronelution bei der Säulenchromatographie.

7.2. Versuchsdurchführung

Es wurden 48 Testosteronbestimmungen durchgeführt nach der eingangs beschriebenen Methode (Extraktion, Säulenchromatographie, Eindampfen des Eluats). Mit Hilfe des dem Serum zugesetzten radioaktiven Testosteronstandards wurde die Ausbeute bestimmt. Dabei wurde die Menge des eingesetzten radioaktiven Standards und die Menge der wiedergefundenen Radioaktivität durch Überführen entsprechender Aliquote in Szintillationsgefäße, Zugabe von Szintillationsflüssigkeit und Messen im Beta-Zähler bestimmt.

7.3. Ergebnis

Bei den 48 Proben wurde eine Ausbeute von 80,1 $\pm$ 9,9 % erreicht. Der Variationskoeffizient beträgt 12,35.

7.4. Bewertung

Beim Vergleich mit der Ausbeute, die bei der alleinigen Extraktion des Serums erhalten wurde, ergibt sich, daß der Verlust auf der Kieselgelsäule ungefähr 15 % beträgt. Verglichen mit Literaturangaben muß eine Wiederfindung von 80 % nach der Chromatographie als sehr hoch angesehen werden.
Der Variationskoeffizient zeigt, daß die Schwankungen in der Lage des Testosteronpeaks bei der Elution gering sind, so daß eine einmalige Überprüfung der Testosteronelution bei Verwendung einer neuen Kieselgelcharge ausreicht.

8. Der Blankwert der Testosteronbestimmungsmethode

Viele der Faktoren, die zum methodischen Blank beitragen, sind rein chemischer Art und können deswegen vermieden werden. Wesentlich wird der Blank durch die Affinitätskonstante des Antiserums beeinflußt, wobei eine geringe

Affinität einen Anstieg des Blanks bewirkt. Zugabe von Proteinen zum Inkubationsmedium wie Rinderserumalbumin, Gamma-Globulin oder Gelatine verhindert die Adsorption von Steroiden an die Wand des Inkubationsgefäßes und kann ebenso wie der Anstieg der Ionenstärke der verdünnten Lösungen durch Salzzugabe den Blank reduzieren.

Die verwendeten Reagenzien können in hohem Maße zum Blank beitragen. Das ist besonders dann der Fall, wenn chromatographische Techniken bei der Vorreinigung des Steroids eingesetzt werden. Getrocknete Rückstände von organischen Lösungsmitteln und lipophile Substanzen beeinflussen die hydrophobe Steroid-Antikörperwechselwirkung. Die bei der Serumextraktion mit organischem Lösungsmittel mit extrahierten Lipide können deswegen die Bestimmung stören, selbst wenn hoch spezifische Antiseren benutzt werden.

Der Blank bei der radioimmunologischen Bestimmung stellt keine konstante Größe dar, so daß es nicht möglich ist, ihn durch Subtraktion eines Reagenzienleerwertes zu eliminieren. Es muß deshalb angestrebt werden, Methoden mit vernachlässigbar kleinem Blank zu entwickeln.

8.1. Gesamtmenge der als Blank wirkenden Substanzen bei der Testosteronbestimmungsmethode

8.1.1. Ziel des Versuches

Es sollte festgestellt werden, wie groß die Gesamtmenge des Blanks der säulenchromatographischen Trennung bei Extraktion von 2 ml aqua dest. ist.

8.1.2. Versuchsdurchführung

Es wurden entsprechend der früher beschriebenen Methode 8 Kieselgelsäulchen hergestellt. Ohne Zugabe eines radioaktiven Standards wurden in einem Spitzkolben 2 ml aqua dest. mit 25 ml Dichlormethan extrahiert. Der Dichlorme-

thanextrakt wurde über einen Phasentrennfilter auf die Säule gegeben. Nach dem Durchlaufen des Dichlormethans wurde mit 25 ml Benzol/Äthylacetat 85/15 eluiert. Die ersten 12 ml des Eluats wurden verworfen, die nächsten 12 ml in einem Inkubationsröhrchen aufgefangen und unter Stickstoff eingedampft. Der Rückstand wurde wie in der Methodik beschrieben mit 0,5 ml Antikörperlösung (Antikörper gegen Testosteron-7-Thioäther-BSA) und radioaktivem Testosteron inkubiert. Weiterhin wurden 4 Inkubationsröhrchen, in die 12 ml des Elutionsmittels Benzol/Äthylacetat 85/15 pipettiert worden waren unter Stickstoff eingedampft und mit 0,5 ml Antikörperlösung und radioaktivem Testosteron in gleicher Weise inkubiert. Zusätzlich wurden zur Herstellung einer Eichkurve entsprechende Testosteronstandards in Inkubationsröhrchen pipettiert, eingedampft und mit Antikörperlösung und radioaktivem Testosteron inkubiert. Die Trennung der freien und gebundenen Fraktion erfolgte mit Charcoal-Dextran-Suspension. Nach dem Abzentrifugieren wurden 0,5 ml des Überstandes im Beta-Zähler gemessen. Nach Aufzeichnen der Eichkurve konnten die Testosteronäquivalente der inkubierten Blank- und Lösungsmittelrückstände aus der Eichkurve abgelesen werden.

8.1.3. Ergebnis

Der Gesamtblank der 8 Kieselgelsäulchen ergab einen Wert von 19,8 $\pm$ 5,2 pg Testosteronäquivalent. Die 4 Proben von 12 ml eingedampftem Benzol/Äthylacetat 85/15 entsprachen einem Testosteronäquivalent von 8,6 $\pm$ 3,5 pg.

8.1.4. Bewertung

Sowohl der reine Lösungsmittelrückstand als auch der Gesamtblank der Säule erbrachten Werte, die bei der Bestimmung kleinerer Testosteronmengen nicht vernachlässigt werden dürfen. Da schon der reine Lösungsmittelrückstand einen außerhalb der Empfindlichkeit der Eichkurve liegenden Wert ergibt, ist es wenig glaubhaft, wenn von verschiedenen Autoren angegeben wird, daß bei ihren chromatogra-

phischen Radioimmunoassays ein Blank von Null vorliege.

8.2. Die Blankgröße bei Durchführung der vollständigen Testosteronbestimmungsmethode

8.2.1. Ziel des Versuches

Es sollte festgestellt werden, wie groß unter vollständigen Versuchsbedingungen der durchschnittliche Blank ist, der den Meßwert störend beeinflußt.

8.2.2. Versuchsdurchführung

Es wurden 3 Versuche mit je 8 Säulchen, die wie eingangs beschrieben hergestellt wurden, durchgeführt. Wie unter Abschnitt 8.1.2. erläutert, wurden ohne Zugabe eines radioaktiven Standards 2 ml aqua dest. im Spitzkolben mit 25 ml Dichlormethan extrahiert und der Extrakt über einen Phasentrennfilter auf die Säule pipettiert. Nach Durchlaufen des Dichlormethans erfolgte die Elution mit 25 ml Benzol/Äthylacetat 85/15. Die ersten 12 ml wurden verworfen, die nächsten 12 ml aufgefangen und unter Stickstoff eingedampft.
Zum Rückstand wurde 1 ml Äthanol gegeben. 0,1 ml der Äthanollösung wurden in ein Inkubationsröhrchen pipettiert, zusammen mit den Eichkurvenröhrchen, die entsprechende Testosteronstandards enthielten eingedampft und mit Antikörperlösung und radioaktivem Testosteron inkubiert. Die Inkubation erfolgte über nacht im Eisschrank bei etwa 4°C. Die Trennung der freien und gebundenen Fraktion wurde mit Charcoal-Dextran-Suspension durchgeführt. Nach Abzentrifugieren wurden 0,5 ml des Überstandes im Beta-Zähler gemessen. Die für die Blankwerte erhaltenen Meßergebnisse wurden über die Eichkurve als Testosteronäquivalente bestimmt.

8.2.3. Ergebnis

In den drei Versuchen mit zusammen 24 Bestimmungen erhielten wir einen durchschnittlichen Blank von $4 \pm 2{,}5$ pg.

In 4 Versuchen ergab sich ein negativer Blank, d.h., die Meßwerte des Blanks lagen höher als die Meßwerte der Eichkurve. Diese Werte wurden bei der Berechnung als Null berücksichtigt.

8.2.4. Bewertung

Beim Vergleich der erhaltenen durchschnittlichen Blankwerte mit den Ergebnissen der Untersuchung über die Empfindlichkeit der Eichkurve zeigte sich, daß die durchschnittlichen Blankwerte innerhalb der Empfindlichkeit der Eichkurve liegen, d.h. innerhalb der Streuung des Nullpunktes. Bemerkenswert ist dabei, daß die Werte höher liegen als nach den Untersuchungen über den Gesamtblank zu erwarten war, der ja zusätzlich bei der vollständigen Methode 1/10 verdünnt wird. Der Vergleich mit in der Literatur angegebenen Werten zeigt, daß der Blank der angewandten Methode in einem vergleichsweise guten bis befriedigenden Bereich liegt. Es muß zur Berücksichtigung des negativen Blanks als Null in unserer Berechnung bezweifelt werden, ob eine solche Handhabung gerechtfertigt ist, da der negative Blank einen bestimmten Meßwert sicherlich nicht so beeinflußt, als ob kein Blank vorhanden wäre.

9. Vergleich der"Löslichkeit" von Kieselgel Bio-Rad in Benzol/Äthylacetat 85/15, Methanol und Äthanol

9.1. Ziel des Versuches

Mit dieser Untersuchung sollte herausgefunden werden, ob die Polarität des Elutionsmittels einen Einfluß auf die Größe des Blanks hat, dadurch, daß sich im polareren Lösungsmittel mehr Kieselgel löst, was zu einer Erhöhung des Blanks beiträgt.

9.2. Versuchsdurchführung

Es wurden 4 Säulenfüllungen entsprechende Mengen Kieselgel

Bio-Rad 15 min. lang mit 13 ml (dem Säulenelutionsvolumen entsprechend) Benzol/Äthylacetat 85/15, 13 ml Methanol oder 13 ml Äthanol ausgeschüttelt. Die Suspension wurde 15 min. lang bei 3000 U/min. in einer Laborzentrifuge zentrifugiert. Der organische Überstand wurde durch 5 mm gewaschene Glaswolle, 2 Glasfiberfilter GF/D und 1 Glasfiberfilter GF/F filtriert. Dies entspricht dem routinemäßigen Abschluß der Kieselgelsäule. Die einzelnen organischen Phasen wurden unter Stickstoff eingedampft. Nach dem Eindampfen war bei Äthanol und Methanol, nicht aber bei Benzol/Äthylacetat 85/15 ein weißlicher Rückstand erkennbar.
Der Rückstand wurde nach Zugabe und Eindampfen von 0,1 ml Äthanol mit 0,5 ml Antikörperlösung und radioaktivem Testosteron inkubiert. Gleichzeitig wurden Standardaliquote in 0,1 ml Äthanol eingedampft und als Eichkurve mit 0,5 ml Antikörperlösung und radioaktivem Testosteron inkubiert. Die Trennung der freien und gebundenen Fraktion erfolgte mit Charcoal-Dextran-Suspension. 0,5 ml des Überstandes wurden nach Abzentrifugieren in Szintillationsgefäße gegeben und nach Zugabe der Szintillationsflüssigkeit gemessen.

9.3. Ergebnis

Unter Verwendung der Eichkurve wurden die Testosteronäquivalente (Blank) des Rückstandes der einzelnen organischen Phasen bestimmt.

Lösungsmittel	Testosteronäquivalent = Blank
Benzol/Äthylacetat 85/15	9,2 ± 2,8 pg
Methanol	20,2 ± 9,8 pg
Äthanol	38,2 ± 10,5 pg

Tab. 4: Lösungsmittel und der dazugehörige Blank

9.4. Bewertung

Die Tabelle 4 zeigt, daß im Vergleich zum unpolaren Benzol/Äthylacetat 85/15 bei Verwendung von Methanol und Äthanol Rückstände auftreten, die einen 2- und 4-fach höheren Blank hervorrufen. Es muß vermutet werden, daß sich entweder Kieselgel oder andere im Kieselgel befindliche Substanzen in Methanol und Äthanol entweder lösen oder so suspendieren, daß sie durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 3000 U/min. in der Laborzentrifuge nicht abzentrifugiert werden können.

Aus diesem Ergebnis folgt, daß reines Methanol oder Äthanol nicht als Elutionsmittel bei der Säulenchromatographie mit Kieselgel verwendet werden dürfen, da sie einen zu hohen Blank erbringen. Sollte die Verwendung dieser Elutionsmittel bei hochpolaren Steroiden notwendig sein, so ist eine weitere Reinigung des eluierten Steroids durch eine Lösungsmittelverteilung bzw. durch eine LH-20-Chromatographie erforderlich, bevor das Steroid mit dem Antikörper beim Radioimmunoassay inkubiert werden kann.

10. Die Empfindlichkeit der Testosteroneichkurve

Die Empfindlichkeit und der Verlauf der Standardkurve beruht auf der Affinität des Antiserums, der Menge an Antikörpern, der Menge des radioaktiven Steroids, dem Inkubationsvolumen und dem Fehler der Methode.

Die Empfindlichkeit der Eichkurve ist definiert als der kleinste Betrag eines Steroidstandards, der bei einer Vertrauensgrenze von 95 % signifikat von Null verschieden ist.

10.1. Ziel des Versuches

Bestimmung der oben definierten Sensitivität der Standardkurve.

10.2. Versuchsdurchführung

Es wurden 5 Doppelbestimmungen der Standardeichkurve bei 0 pg, 3,125 pg und 6,25 pg nach der üblichen Methode mit Testosteronantiserum (Antikörper gegen Testosteron-7-Thioäther-BSA) und radioaktivem Testosteron inkubiert. Die freie und gebundene Fraktion wurde mit Charcoal-Dextran-Suspension getrennt. 0,5 ml des Überstandes wurden im Beta-Zähler gemessen.

10.3. Ergebnis

pg eingesetztes Testosteron	cpm	2s
0	1196 ± 44,6	89,2
3,125	1216 ± 38,8	77,6
6,25	1110 ± 37,9	75,8

10.4. Bewertung

Bei 5 Doppelbestimmungen ist in der Eichkurve ein Testosteronstandard von 6,25 pg mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % (p 0,01) von Null verschieden. Ferner zeigt sich bei 5 Doppelbestimmungen des Nullpunktes, daß die Streuung 2s des Nullpunktes von 7 pg unterschieden werden kann.

Bei der Annahme, daß 7 pg signifikat von Null verschieden sind, einer Verdünnung von 1/10 in 1 ml Äthanol und durchschnittlicher Ausbeute von 80 % der Gesamtmethode müssen etwa 88 pg Testosteron in der Serumprobe vorliegen, um nachgewiesen werden zu können. Eine Steigerung der Nachweisbarkeitsgrenze ist praktisch nur durch Verringerung der Verdünnung zu erzielen.

11. Der Variationskoeffizient der Methode und der Einfluß verschiedener Darstellungen der Eichkurve auf diesen

11.1. Ziel des Versuches

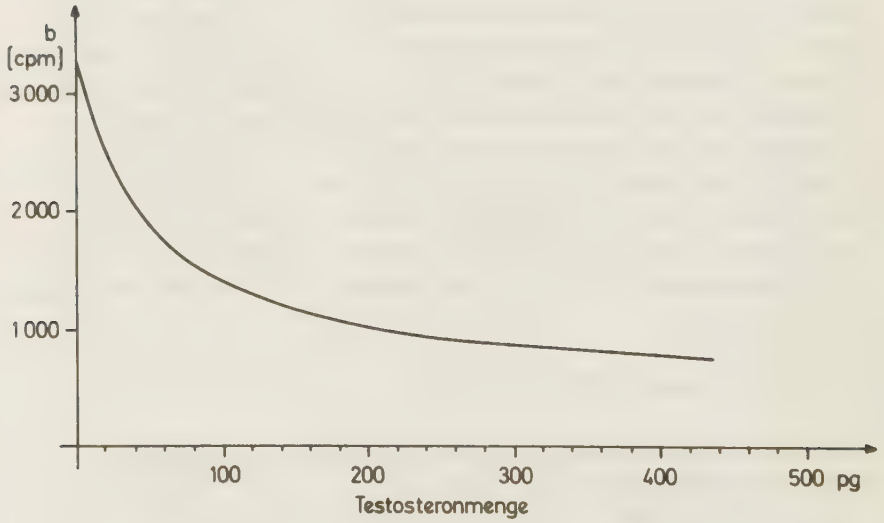
Der Gesamtirrtum bei der Bestimmung mit dem Radioimmunoassay setzt sich aus der statistischen Summe zweier unabhängiger Größen zusammen: a) dem Zählirrtum bei der Radioaktivitätsmessung und b) dem experimentellen Irrtum, dessen Größe und Variation nur durch experimentelle Beobachtung abgeschätzt werden kann. Beide Faktoren beeinflussen die Streuung des zu bestimmenden Wertes und werden meist durch den Variationskoeffizienten beschrieben. Wir wollten in diesem Versuch zum einen feststellen, wie groß die Gesamtstreuung der Methode ist, zum anderen, welchen Einfluß das Ablesen der Werte an mehr oder weniger durch mathematische Umwandlung linearisierten Eichkurven auf den Variationskoeffizienten hat (18).

11.2. Versuchsdurchführung

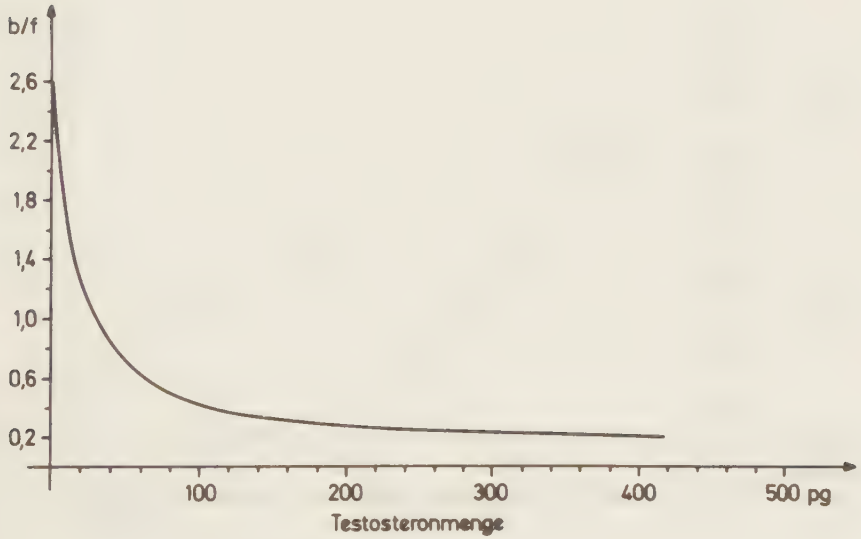
10 Serumproben eines männlichen Poolplasmas wurden nach der beschriebenen Methode aufgearbeitet. Die Eichkurve wurde nach verschiedenen Methoden durch Verwendung linearisierender Formeln und linearer, semilogarthmischer und logarithmischer Darstellung aufgetragen (Abb.9) und die Testosteronkonzentration an den verschiedenen Eichkurven abgelesen. Von den an den verschiedenen Eichkurven abgelesenen Werten wurde der Mittelwert gebildet und der Variationskoeffizient berechnet.

11.3. Ergebnis

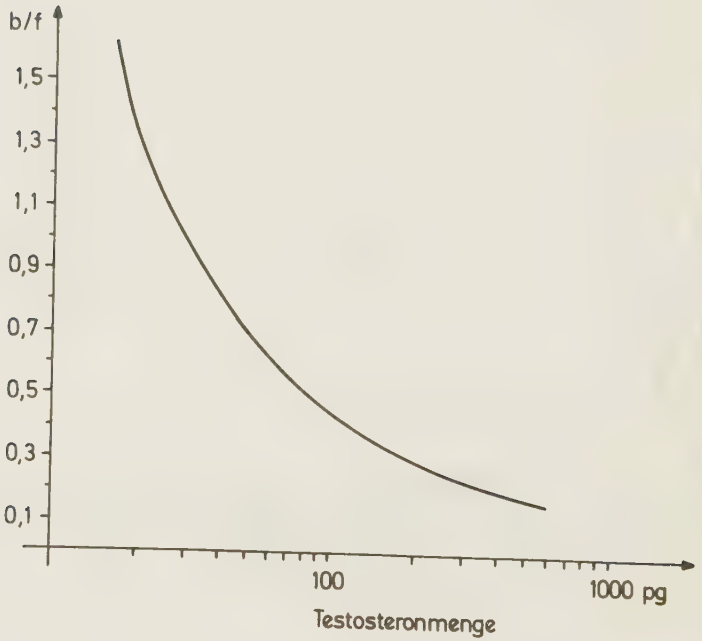
Die Tabelle 5 zeigt die an den verschiedenen Eichkurven abgelesenen Mittelwerte, die Streuung der Mittelwerte und die Variationskoeffizienten.



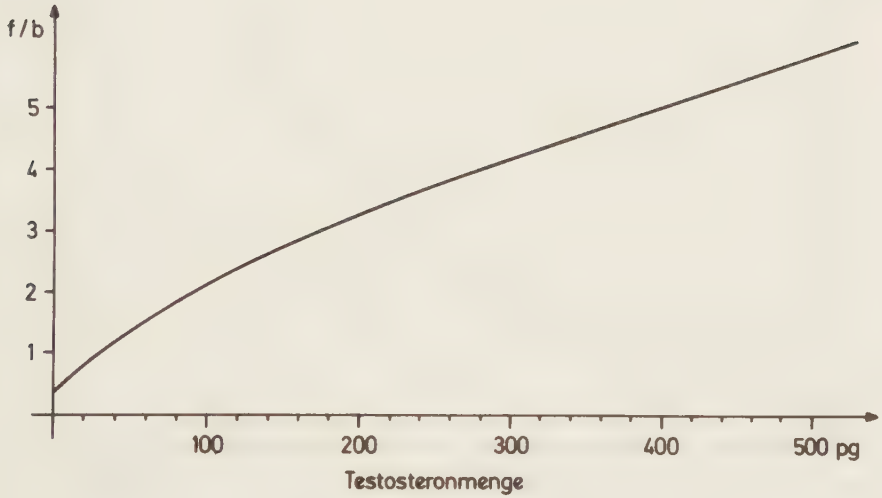
a) linear



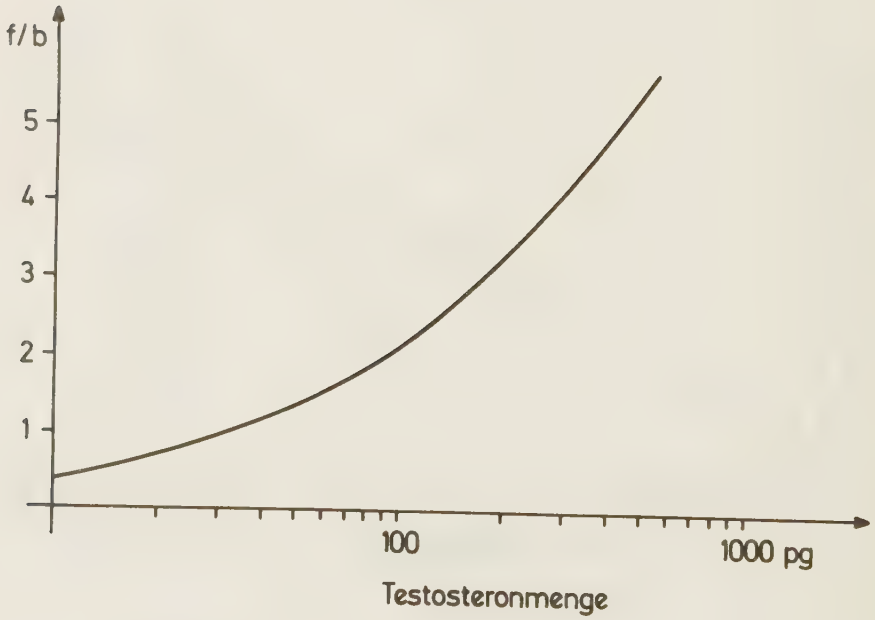
b) linear



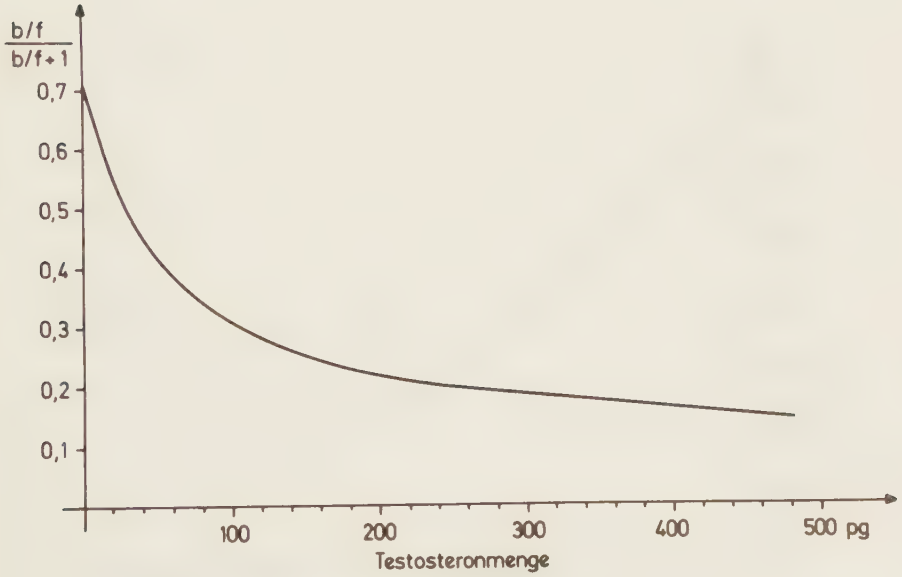
c) semilogarithmisch



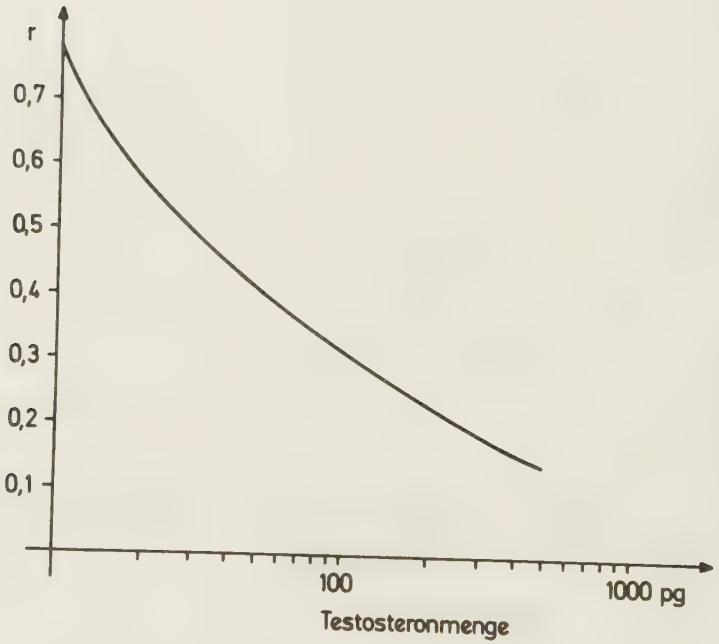
d) linear



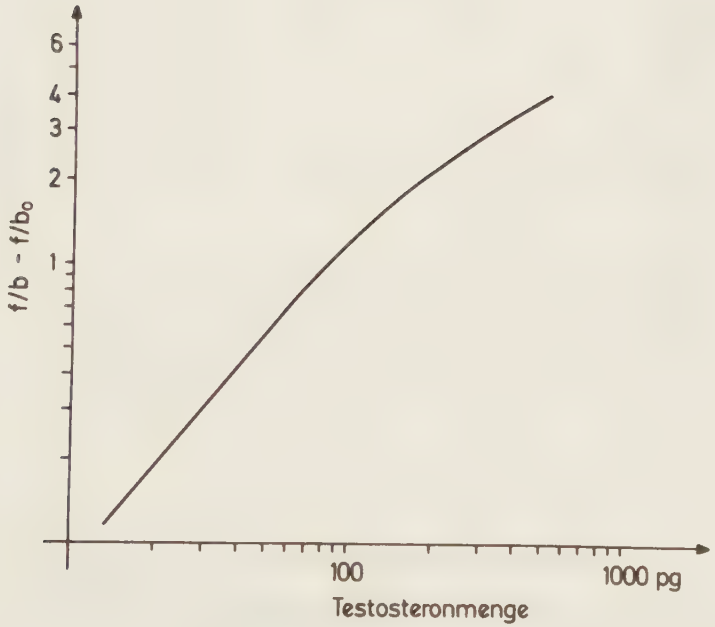
e) semilogarithmisch


b/f
b/f+1
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
100
200
300
400
500 pg
Testosteronmenge

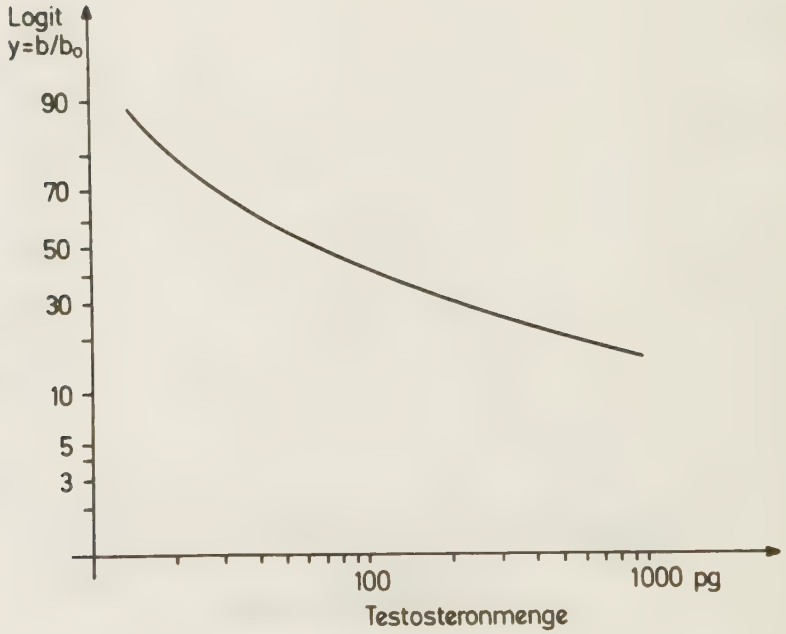
f) linear



g) semilogarithmisch



h) log-log



i) Logit-Log

Abb. 9: a) - i): verschiedene Formen der Eichkurvendarstellung
b = gebundene Fraktion, f = freie Fraktion
b_o = gebundene Fraktion am Nullwert

Art der Darstellung Menge Testosteron gegen	Mittelwert $\bar{x}$	Variationskoeffizient CV
b linear	656,6 ± 107,6	16,3
b/f linear	669 ± 86,1	12,8
b/f semilogarithmisch	650,4 ± 90,0	13,8
f/b linear	658 ± 84,0	12,7
f/b semilogarithmisch	648 ± 81,7	12,6
$\frac{b/f}{b/f + 1}$ = r linear	639 ± 95,4	14,9
r semilogarithmisch	667 ± 83,7	12,5
$f/b - f/b_o$ log.	657 ± 93,9	14,2
f/b_o x 100 Logit-Log	631 ± 104,2	16,5

Tab. 5: Mittelwerte und Variationskoeffizienten der an den in Abb. 9 dargestellten Eichkurven abgelesenen Werte
b = gebundene Fraktion; f = freie Fraktion;
b_o = gebundene Fraktion am Nullwert

11.4. Bewertung

Es fällt auf, daß sowohl die Mittelwerte als auch die Variationskoeffizienten streuen. Die Varationskoeffizienten der an 9 verschiedenen Kurvendarstellungen abgelesenen Werte schwanken zwischen CV = 12,5 und CV = 16,5. Dabei zeigt die Darstellung, bei der unter Verwendung einer linearen Abszisse und Ordinate die gebundene Radioaktivität gegen die Testosteronkonzentration aufgetragen wird mit Abstand das schlechteste Ergebnis. Eine teilweise Linearisierung durch Verwendung der Quotienten von freier und gebundener Fraktion in der Ordinate und linearer oder logarithmischer Darstellung in der Abszisse verbessert die Ablesegenauigkeit und führt somit zu einem besseren Varia-

tionskoeffizienten. Eine fast völlige Linearisierung wie sie durch Verwendung des Logit-Log-Verfahrens (20) und des log-log-Verfahrens (19) erreicht wird, hat in diesem Versuch keine weitere Verbesserung der Ablesegenauigkeit und des Variationskoeffizienten erbracht.

Aus dem Ergebnis folgt, daß durch eine einfache mathematische Umformung der gebundenen und freien Fraktion und in dem entsprechenden Koordinatensystem eine nicht zu vernachlässigende Verbesserung des Variationskoeffizienten erreicht werden kann.

12. Die Wiederfindung eingesetzter bekannter Testosteronmengen

12.1. Ziel des Versuches

In diesem Versuch wollten wir die Richtigkeit der Methode durch Extraktion und Bestimmung bekannter Testosteronmengen überprüfen.

12.2. Versuchsdurchführung

Zu 2 ml aqua dest. wurden 0,5 ng, 1,0 ng, 2,5 ng und 5,0 ng Testosteron pipettiert, das in Benzol/Äthanol 9/1 gelöst war. Nach der beschriebenen Methode wurden die bekannten Testosteronmengen extrahiert und bestimmt. In einem Koordinatensystem wurden die wiedergefundenen Mengen gegen die eingesetzten Mengen aufgetragen.

12.3. Ergebnis

eingesetzte Menge	wiedergefundene Menge
0,5 ng	0,46 ng
1,0 ng	1,2 ng
2,5 ng	2,7 ng
5,0 ng	4,7 ng

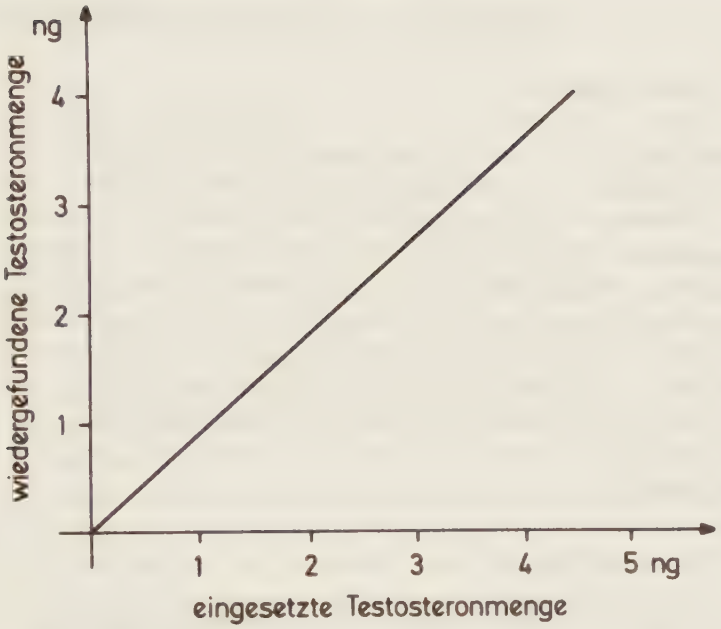


Abb. 10: Darstellung der Wiederfindung

12.4. Bewertung

Wie die Abb. 10 zeigt, entsprechen die wiedergefundenen Mengen gut den eingesetzten. Ein systematischer Fehler ist nicht zu erkennen, da die Verbindungslinie der dargestellten Punkte durch den Nullpunkt geht.

13. Zur Durchführung der Versuche benutzte Hilfsmittel

13.1. Reagenzien

Dichlormethan (J. T. Baker Chemicals, BV.-Deventer) Benzol (Fluka AG), Essigsäureäthylester, Diäthyläther (Merck), Äthanol (C. Roth KG, Karlsruhe), physiologische Kochsalzlösung (Fresenius, Bad Homburg), Methanol (Riedel-De Haen AG), Phosphatpuffer pH 7,4, Rinder-Gamma-Globulin (Serva, Heidelberg), 0,1 % Natriumazid (Fluka AG), Testosteron (Merck), [1,2-^{3}H] Testosteron, 5α-Dihydrotestosteron (Merck), 5α-Dihydro-[1,2-^{3}H]Testosteron, Antikörperlösung (Antikörper gegen Testosteron-7-Thioäther-BSA), Szintillationsflüssigkeit Szintigel (C. Roth), Norit A, Dextran (Serva)

13.2. Glasgeräte

Spitzkolben nach Maß (Volumen 30 ml), 20 ml-Meßpipetten, Eppendorfpipetten 0,5 ml und 1 ml, Hamilton-Pipette (10 μl), Säule nach Maß, Glastrichter, Inkubationsröhrchen aus Glas (12 ml), Zentrifugengläser, groß, Eppendorfgefäße, Szintillationsgefäße

13.3. Apparative Ausrüstung

Laborzentrifuge, Wasserbad, Exsiccator, Wasserstrahlpumpe, Magnetrührer, Vortex-Mixer, Kühlzentrifuge, Packard

13.4. weitere Hilfsmittel

Phasentrennfilter (Whatman), mit Methanol vorgereinigte Glaswolle, Glasfaserfilter GF/D und GF/F (Whatman), Kieselgel Bio-Rad Bio-Sil A 200-325 mesh (Laboratories)

III. Zusammenfassung

1. Nachdem 1969 der erste Radioimmunoassay für Plasmasteroide veröffentlicht wurde, verdrängte die radioimmunologische Steroidbestimmung fast völlig alle anderen, zur quantitativen Steroidbestimmung eingesetzten Methoden, da sie die empfindlichste ist.
   Als Schwierigkeit erwies sich die Synthese von solchen Steroidantigenen, die nach dem Immunisieren von Tieren zur Produktion spezifischer nur gegen ein Steroid gerichteter Antikörper führen. Eine geringe Spezifität des Antiserums macht die chromatographische Vorreinigung der zu bestimmenden Probe erforderlich, die den zeitaufwendigsten Faktor der radioimmunologischen Bestimmung darstellt.
   Da es uns nicht gelang, solche Antigene zu synthetisieren, die zu Antikörpern gegen Testosteron von sehr hoher Spezifität führten und deswegen eine chromatographische Reinigung weiterhin notwendig machten, entwickelten wir ein chromatographisches Verfahren, das es ermöglicht, eine größere Anzahl von Proben gleichzeitig zu bestimmen, und damit die Praktikabilität der Methode erhöht.
   Die Chromatographie erfolgte nach Extraktion des Testosterons aus dem Serum mit einer Kieselgelmikrosäule.

2. Ergebnisse

   a) Das von uns durch Immunisieren von Neuseelandkanninchen mit Testosteron-7-Thioäther-BSA erhaltene Antiserum zeigte nur für 5α-Dihydrotestosteron eine zu berücksichtigende Kreuzreaktion von 65 %, so daß dieses als die Bestimmung störendes Steroid entsprechend der Fragestellung abgetrennt werden muß.

   b) Nach einmaliger Extraktion mit Dichlormethan ergab sich bei 8 Proben eine Ausbeute von 93,2 $\pm$ 6,2 % der eingesetzten radioaktiven Testosteronmengen.

   c) Bei der Durchführung der Säulenchromatographie erfolgte

eine eindeutige Trennung von Testosteron und 5α-Dihydrotestosteron sowohl bei Verwendung des Elutionsgemisches Benzol/Äthylacetat 85/15 als auch des Elutionsgemisches Dichlormethan/Äther 80/20. Der Testosteronpeak konnte gut reproduzierbar ohne Überlappung mit dem 5α-Dihydrotestosteronpeak mit der Elutionsfraktion vom 12.-22. ml aufgefangen werden. Weniger polare Mischungsverhältnisse der angegebenen Elutionsmittel führten nicht zu einer guten Trennung der beiden Steroide.

d) Der mögliche Einfluß von Cholesterin auf die Bestimmung konnte ausgeschlossen werden, da nur ein Viertel der den Proben zugesetzten radioaktiven Cholesterinmengen durch einmaliges Ausschütteln mit Dichlormethan extrahiert wurden. Davon befanden sich nach der Chromatographie etwa Dreiviertel in der Dichlormethanfraktion. Nur etwa 4 % des extrahierten Cholesterins wurden in der Testosteronfraktion nachgewiesen.

e) Bei der Durchführung von 48 Testosteronbestimmungen betrug die Ausbeute nach Extraktion und Chromatographie 80,1 $\pm$ 9,9 %, so daß der Verlust auf der Kieselgelsäule mit 15 % anzugeben ist.

f) Der Gesamtblank der Methode ergab bei 8 Kieselgelsäulen einen Wert von 19,8 $\pm$ 5,2 pg Testosteronäquivalent. Der reine Lösungsmittelblank betrug 8,6 $\pm$ 3,5 pg. Beide Werte lagen außerhalb der Empfindlichkeit der Eichkurve. Die Blankgröße bei der Durchführung der vollständigen Bestimmungsmethode betrug 4 $\pm$ 2,5 pg und lag damit innerhalb der Empfindlichkeit der Eichkurve.

g) Die Empfindlichkeit der Eichkurve wurde in 5 Doppelbestimmungen als 6,25 pg ermittelt, so daß etwa 88 pg in einer Serumprobe vorliegen müssen, um nachgewiesen werden zu können.

h) Durch eine Veränderung der Darstellung der Eichkurve mittels mathematischer Umformung der freien und gebundenen Fraktion und Darstellung in einem entsprechenden Koordinatensystem wurde eine nicht zu vernachlässigende Ver-

besserung des Variationskoeffizienten der Methode erreicht, der abhängig von dieser zwischen CV = 12,8 und CV = 16,3 schwankte.

i) Bei der Überprüfung der Wiederfindung konnten wir feststellen, daß die wiedergefundenen Mengen gut den eingesetzten entsprachen, so daß ein systematischer Fehler auszuschließen war.

Diese Ergebnisse zeigen, daß sich die vorliegende Methode, verglichen mit anderen, durch hohe Ausbeute, gute Reproduzierbarkeit, guten Blank, große Empfindlichkeit und hohe Wiederfindungsrate auszeichnet. Die Vereinfachung des chromatographischen Verfahrens und die damit einhergehende Erhöhung der Praktikabilität gestatten es, 20 Bestimmungen pro Tag durchzuführen.

IV. Literaturverzeichnis

1) ABRAHAM, G.E.: Solid-phase radioimmunoassay of estradiol-17-beta
J. Clin. Endocrin. 29:866 (1969)

2) ABRAHAM, G.E.: Radioimmunoassay of Steroids in Biological Materials
Acta Endocr. (Kbh) Suppl. 183:11 (1974)

3) BERSON, S.A., YALOW, R.S.: Assay of Plasma Insulin in Human Subjects by Immunological Methods
Nature, Lon. 184:1648 (1959)

4) EKINS, R., NEWMAN, B.: Theoretical aspects of saturation analysis
Acta Endocr. Suppl. 147:11 (1970)

5) ERLANGER, B.F., BOREK, F., BEISER, S. M., LIEBERMANN, S.: Steroid-protein conjugates: I. Preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with testosterone and with cortisone
J. biol. chem. 228:713 (1957)

6) HERMANDEZ, J., AXELROD, L.R.: Chromatographic separation of the steroids from the total lipid extracts
Analytical Chemistry 35:80 (1963)

7) HILLIER, S.G., BROWUSEY, B.G., CAMERON, E.H.: Some observations on the determination of testosterone in human plasma by radioimmunoassay using antisera raised against testosterone-3-BSA and testosterone-11-BSA
Steroids 21:735 (1973)

8) JOYCE, B.G., FAHMY, D., HILLIER, S.G.: Specific determination of testosterone in female plasma by radioimmunoassay: a rapid and relable procedure for the routine clinical laboratory
Clin. Chim. Acta 62:231 (1975)

9) LINDNER, H.R., PEREL, E., FRIEDLANDER, A., ZEITLIN, A.: Specific of Antibodies of ovarien Hormons in Relation to the Site of Attachment of the Steroid Hapten of the Peptide Carrier
Steroids 19:357 (1972)

10) MIDGLEY, A.R., NISWENDER, G.D., GAY, V.L., GORDON, D., REICHERT, L.E.: Use of Antibodies of Characterization of Gonadotropins and Steroids
Rec. Progr. Horm. Res. 27:235 (1971)

11) MÜLLER, R., SCHEUER, A., GERDES, H., MOSEBACH, K.O.: Glyanhydrazid als bifunktionelles Reagenz zur Synthese von Antigenen mit Steroiden als immundeterminate Gruppen
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. Bd. 357:1007 (1976)

12) NIESCHLAG, E.,WICKINGS, E.J.: A review of Radioimmunoassay for Steroids
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 13:261 (1975)

13) RODBASD, D., BRIDSON, W., RAYFORD, P.L.: Rapid calculation of radioimmunoassay results
Laborat. clin. Med. St. Louis 74:770 (1969)

14) RODBASED, D., LEWALD, J.E.: Computer analysis of radioligand assay and radioimmunoassa data
Acta Endocr. Suppl. 147:79 (1970)

15) ROSENFIELD, R.L., EBERLEIN, W.R., BONGIOVANNI, A.M.: Measurement of plasma testosterone by means of competitive protein binding analysis
J. Clin. Endocr. 29:854 (1969)

16) ROTH, J., GLICK, S.M., KLEIN, L.A., PETERSEN, M.J.: Specific Antibody to Vasopressim in Man
J. Clin. Endocr. 26:671 (1966)

17) VAITUKAITIS, J., ROBBINS, J.B., NIESCHLAG, E., ROSS,G.T.: A Method of Producing Specific Antisera with Small Doses of Immunogen
J. Clin. Endocr. 33:988 (1971)

18) VAN OSS, C.J.: Principles of Immunology
(Rose N.R., Milgrom I, van Oss C.J., eds):11 (1973)
Macmillan, New York

19) VECSEI, P.: Persönliche Mitteilungen

20) VETTER,W., VETTER, H., SIEGENTHALER, W.:
Radioimmunoassay for Aldosterone witnout
Chromatography. 1. Determination of Urinary
18- glucuronide Exretion
Acta Endocr. (Kbh) 74: 548 (1973)

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. H. Gerdes für die Betreuung der Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. A. Scheuer, der mich jeder Zeit bei der Vorbereitung und Durchführung der Versuche hilfreich und mit viel Aufmerksamkeit unterstützt hat.

Meine akademischen Lehrer während des Studiums der Humanmedizin an der Philipps-Universität in Marburg waren die Herrn Professoren:

Amon, Arndt, Bode, Braasch, Buchholz, Daume, Denecke, Dittrich, Dimroth, Eißner, Eschenbach, Exner, Friederich, Ganz, Gerdes, Golenhofen, Haberich, Hamelmann, Hardewig, Havemann, Hensel, Hess, Hort, Jacob, Karlson, Klaus, Kleinsasser, Koecke, Koransky, Lange, Linneweh, Mannheim, Martini, Petry, Pots, Riecken, Rodeck, Rohen, Schmitz-Moormann, Schneider, Siegert, Sodomann, Straub, Walcher

Lebenslauf

Am 11.8.1950 wurde ich als Tochter des Kaufmanns Kurt Jordan und seiner Ehefrau Herta, geb. Heuchemer in Arbenberg bei Koblenz geboren.

Von 1957 bis 1961 besuchte ich die Volksschule in Koblenz-Asterstein, anschließend das Hilda-Gymnasium in Koblenz. Wegen eines Umzuges meiner Eltern nach Marburg wechselte ich 1967 auf die Elisabeth-Schule in Marburg über, wo ich am 12.6.1969 das Abitur bestand.

Am 15.10.1969 begann ich mit dem Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität in Marburg. Dort legte ich die Naturwissenschaftliche Vorprüfung am 3.10.1970, die Ärztliche Vorprüfung am 27.3.1972 und das Medizinische Staatsexamen am 26.8.1975 ab.

Vom 1.10.1975 bis 31.5.1976 war ich als Medizinalassistentin in der Medizinischen Universitätsklinik in Marburg, vom 1.9.1976 bis 31.12.1976 in der Chirurgischen Universitätsklinik in Marburg tätig. Am 31.1.1977 wurde mir die Approbation als Ärztin erteilt.

Vom 1.3.1977 bis 30.9.1977 war ich als Assistenzärztin in der Abteilung für Anästhesie des Städtischen Krankenhauses Neukölln in Berlin tätig. Am 1.10.1977 wechselte ich zur chirurgischen Abteilung des gleichen Hauses über.